

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Reaktív oxigéngyökök szerepe a pollen indukált allergiás  
gyulladás szenzitizációs és kiváltási fázisában**

Csillag Anikó

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2014

## **Reaktív oxigéngyökök szerepe a pollen indukált allergiás gyulladás szenzitizációs és kiváltási fázisában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

**Csillag Anikó**

okleveles biológus (molekuláris biológus)

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora  
Dr. Prechl József, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2014. szeptember 16. 12 óra, DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet C épület tárgyalóterme

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Luciana Dini, DSc  
Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Luciana Dini, DSc  
Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora  
Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora  
Dr. Prechl József, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2014. szeptember 16. 14 óra, DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

## 1. Bevezetés

Az allergiás megbetegedések, mint például az allergiás asztma és rhinitis előfordulási gyakorisága az utóbbi néhány évtizedben drámai módon megnövekedett a fejlett országokban. A WHO (World Health Organization) adatai szerint 2005-ben világszerte 300 millió ember szenvedett asztmában. Ezek a betegségek jelentős mértékben rontják az egyének életminőségét, valamint számottevő a szociológiai és gazdasági hatásuk is. Egy 2009-ben végzett felmérés szerint Magyarország lakosságának kb. 50%-a parlagfű-szenzitizált. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a parlagfű szenzitizáció gyakorisága, összehasonlítva más közép- vagy nyugat európai ország adataival, Magyarországon messze a legmagasabb.

Az IgE ellenanyagok által mediált légúti allergiás reakciók kialakulása két szakaszra bontható. Az első szakasz a szenzitizációs fázis, amit az elicitációs vagy kiváltási fázis követ.

### 1.1 Az allergiás reakciók kialakulásának első fázisa – a szenzitizáció

A légúti allergiás reakciók elindításában az antigén prezentáló sejtek (APS-ek) egyik specializált populációja, a dendritikus sejtek (DS-ek) alapvető szerepet játszanak azáltal, hogy hidat képeznek a veleszületett és szerzett immunfolyamatok között.

Számos DS alpopulációt azonosítottak a légutak különböző részein, melyek eltérő funkciókkal jellemezhetők. A légcső és a hörgők nyálkahártyájában jól fejlett hálózatot képeznek az intraepitheliális DS-ek. Ezeknek a sejteknek a nyúlványai (dendritjei) a légúti hámsejtek közé hatolva még „steady state” körülmények között is monitorozzák a légutak lumenjét. Más légúti DS alpopulációk a légutak szubmukózális részében, valamint a tüdő parenchymában helyezkednek el, ezeknek a feladata a tüdőben az effektor CD4<sup>+</sup> T sejtek aktiválása és restimulálása. A plazmacitoid DS-ek (pDS-ek) „steady state” körülmények között csak kis számban fordulnak elő a légutakban és hozzájárulnak az inhalációs toleranciához úgy, hogy miután felveszik az ártalmatlan antigéneket, elősegítik a regulátor T sejtek (Treg-ek) fejlődését.

A DS-ek legfontosabb feladata az antigén felvétele és elszállítása a környéki nyirokcsomókba, ahol bemutatják a peptid-antigéneket a naív T sejteknek és indukálják azok proliferációját és differenciálódását.

A DS-ek érésehez/aktivációjához legalább két jel szükséges. Az egyik jelet elsődlegesen a receptor-mediált antigén felvétel szolgáltatja, míg a második jelet az antigén felvétel folyamata során a patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) és „veszély szignálok”

(DAMP) észlelése eredményezi. Maguk az allergének is hordozhatnak vagy kiválthatnak veszély jeleket, melyek képesek a DS-ek aktiválására és a Th2 irányú immunválasz elindítására. A legtöbb allergén rendelkezik proteolitikus aktivitással, mely hozzájárul az allergiás betegségek pathogeneziséhez azáltal, hogy megkönnyíti az allergének átjutását a hámsejt rétegen keresztül és befolyásolja a veleszületett immunitás sejtjeinek működését. Ismert továbbá, hogy egyes növényfajok pollenjéből bioaktív lipidek (pollen asszociált lipid mediátorok) szabadulnak fel, valamint adenzint is tartalmaznak, ami szintén hozzájárul a Th2 sejtek differenciációjához. Ezekon kívül a pollenszemek NAD(P)H oxidáz enzimjeik révén reaktív oxigénradikálok (ROS-ok) termelésére is képesek.

Miután a DS-ek érzékelték és felvették az antigént, az afferens nyirokerekken keresztül a környéki nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a feldolgozott antigéneket a T sejteknek bemutatják és elindítják a megfelelő T sejt válaszokat. Ez a folyamat nagymértékben függ a DS-ekből származó jelektől, így az MHC-peptid komplexek mennyiségétől (szignál 1), a sejt felszíni kostimulátor molekuláktól (szignál 2) és a termelt citokinektől és kemokinektől (szignál 3). Az allergének által aktivált Th2 sejtek nagy mennyiségű IL-4, IL-5 és IL-13 citokineket termelnek, melyek a hízósejtek és eozinofil granulociták toborzásában, valamint a B sejtek IgE izotípus váltásában játszanak szerepet. Az IgE a hízósejtek és a bazofil granulociták sejt felszínén lévő nagy affinitású IgE receptorhoz kötődik (FcεRI), így ezek a sejtek szenzitizálttá válnak.

## **1.2 Kiváltási fázis**

Ismételt allergén expozíció a hízósejtek FcεRI receptorához kötődött IgE kereszt-kötéséhez vezet, majd az ezt követő intracelluláris jelátviteli folyamatok eredményeként számos biológiailag aktív termék szekréciója indul meg. Azok a mediátorok, melyek citoplazmatikus granulumokban tárolódnak - mint a biogén aminok, szerin proteázok, proteoglikánok - az allergén expozíciót követően percekben belül felszabadulnak. Hasonlóképpen az aktivált hízósejtek által újonnan termelt mediátorok a leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), LTC<sub>4</sub>, bizonyos citokinek és növekedési faktorok szintén granulumokkal asszociáltak. Ezek a mediátorok hozzájárulnak a korai kiváltási fázis tüneteinek kialakulásához, mint például a megnövekedett érpermeabilitás, a bronchus-simaizom összehúzódás és a megnövekedett nyáktermelés, mely köhögést és légzési nehézséget eredményez. Az FcεRI által mediált szignálok mellett alternatív mechanizmusok is elősegítik a hízósejtekből történő mediátor felszabadulást. Az allergiás folyamatok során a hízósejtekre

a pollenszemek által, illetve a szövetekbe vándorló gyulladásozó sejtek által termelt reaktív gyökök is hatnak. Nemrégén kiderült, hogy a parlagfű pollen kivonata ROS termelés révén aktiválja az RBL-2H3 sejteket (bazofil leukémia sejtvonala) és IgE-től független mediátor felszabadulást idéz elő.

### 1.3 Oxidatív stressz a légutakban

A légúti allergének által kiváltott allergiás gyulladás szoros összefüggésben van az oxidatív stressz kialakulásával, amelyet a ROS termelés és az antioxidáns valamint a gyökfogó mechanizmusok megbomlott egyensúlya eredményez.

A légutakban kialakuló oxidatív folyamatokban az endogén és exogén forrásokból is származó szabadgyökök fontos szerepet játszanak.

A gyulladásozó sejtek, mint a makrofágok, neutrofil és eozinofil granulociták tekinthetők az endogén reaktív oxigéngyökök elsődleges forrásainak. Ezek az aktivált gyulladásozó sejtek különböző enzimek (például NADPH oxidázok, a xantin oxidáz rendszer), valamint a mitokondriális légzési lánc működése révén szuperoxid anion ( $O_2^-$ ) termelésére képesek. A neutrofil granulociták szabadgyök termelése a légúti gyulladás súlyosságával korrelál. A légúti makrofágok asztmás betegekben nagyobb mennyiségű  $O_2^-$ -t termelnek, mint egészségesekben. A környezeti tényezők, mint az ózon, a dízelmotorok kipufogófüstje, a cigarettafüst szintén hozzájárulnak a szabadgyökök termelődéséhez a tüdőben, ami a tünetek felerősödését eredményezheti.

A ROS oxidáló hatását a redukáló ágensek, az antioxidánsok védik ki, amelyeket biokémiai tulajdonságuk alapján feloszthatjuk enzimatikus vagy nem enzimatikus antioxidánsokra. A tüdőben az előbbiek között tartjuk számon a szuperoxid dizmutázt, a katalázt, a glutation peroxidázt és a tioredoxint. Nem enzimatikus antioxidánsok például a mucin, a húgysav/urát, a glutation, az aszkorbinsav, a ceruloplasmin, a transferrin, az E vitamin, a ferritin és a bilirubin.

Az utóbbi 10 évben számos új elemmel bővült az ismeretünk az oxidatív stressz és a légúti allergének által okozott allergiás gyulladás közti összefüggésről. Kiderült, hogy különböző növényfajok, köztük az erősen allergén gyomok (pl.: parlagfű), fák és fűfélék pollenjei NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkeznek. A prooxidáns aktivitással rendelkező hidratált pollenszemek, valamint a belőlük felszabaduló szubpollen részecskék fontos szerepet játszanak az allergiás gyulladás kezdeti szakaszában. Bebizonyosodott, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyökök oxidatív stresszt indukálnak szenitizált

egerek tüdejében és kötőhártyájában percekkel a pollen expozíciót követően. Ez az első szignál a tüdőbe toborozza a neutrofil granulocitákat, függetlenül az adatív immunválaszoktól. A pollenszemek által termelt ROS-ok hatását a humán DS-ekre korábban még nem vizsgálták.

#### **1.4 Statikus mágneses mező (SMM)**

Számos tanulmány beszámol arról, hogy a mágneses mezők hatással vannak különféle sejtfunkciókra, habár az SMM és a sejtek között lezajló interakciók mechanizmusai még nem teljes mértékben ismertek. Az egyik lehetséges mechanizmus az SMM közvetlen kölcsönhatása a szabadgyökökkel, befolyásolva a membrán- és más élettani folyamatokat. A másik feltételezett mechanizmus a szervezet oxidáns/antioxidáns egyensúlyának megváltoztatása. Az SMM továbbá befolyásolhatja az elektronok spinjét, ami a kémiai reakciók kinetikájában bekövetkező változásokhoz és a sejtfunkciók módosulásához vezethet.

Az SMM által kifejtett pozitív hatásokat, melyeket az oxidatív stressz mutatók mérséklésével, valamint az oxidatív stressz markerek szintjének csökkenésével fejt ki, számos tanulmány leírta. Ugyanakkor az irodalmi adatok ellentmondásosak ezen a kutatási területen, mivel más eredmények azt mutatják, hogy az SMM stabilizálja a szabadgyököket, így növeli a koncentrációjukat és a sejtek közötti diffundálásukat, mely oxidatív károsodáshoz vezethet. Az eddig megfigyelt egymásnak ellentmondó hatásoknak az lehet az oka, hogy különböző sejtípusokon és élő szervezetekben különböző erősségű SMM hatásait vizsgálták.

Munkánk során az SMM hatását a ROS termelő parlagfű pollen által indukált légúti allergiás gyulladásra egy olyan mágneses berendezéssel vizsgáltuk, amelyet László János és munkatársai fejlesztettek ki. Ez a kutatócsoport korábban kimutatta, hogy kísérleti egerek teljes testét érő inhomogén SMM erős fájdalomcsillapító hatást fejt ki az ún. vonaglasi tesztekben és csökkenti a gyulladással mechanikai fájdalommal szembeni fokozott érzékenységet. Valamint azt is kimutatták, hogy az SMM gátolta a makrofágok pro-inflammatorikus citokin termelését.

Ezen korábbi adatok alapján kívántuk vizsgálni egérmodellben az SMM expozíció hatását pollen által indukált légúti allergiás gyulladásra. Jelenleg tudomásunk szerint nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat az SMM pollen által kiváltott allergiás gyulladásra való hatásáról.

## 2. Célkitűzések

Munkánk során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- A ROS termelő pollenszemek képesek-e oxidatív stressz kiváltására humán monocita eredetű DS-ekben?
- A pollenszemek által indukált oxidatív stressz vajon befolyásolja-e a veleszületett immunválaszokat azáltal, hogy hozzájárul a DS-ek aktiválásához és citokintermeléséhez?
- Befolyásolják-e a pollen eredetű ROS-ok a pollen antigén dependens adaptív immunválaszokat a DS-ek funkcióinak megváltoztatásán keresztül?
- Az inhomogén SMM-nek van-e hatása a pollen indukált légúti allergiás gyulladás szenzitizációs és elicitációs fázisára *in vivo* modell rendszerben?
- Milyen mechanizmuson keresztül fejt ki a hatását az inhomogén SMM a légúti allergiás gyulladásban?

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Pollen expozíció hatása humán monocita eredetű DS-ekre

##### *Monocita izolálás és a DS-ek tenyésztése*

Egészséges véradó donoroktól származó „buffy coat” mintákat a Debreceni Regionális Vérellátó Központtól szereztük be, az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatójának és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának írásos engedélyével. Humán perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMCs) Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) segítségével végzett sűrűség gradiens alapú elválasztási eljárással nyertük ki. A monocitákat a PBMC frakcióból pozitív szelekcióval paramágnesesen jelölt anti-CD14 ellenanyag (Miltenyi Biotec, Bergshagen, Germany) segítségével izoláltuk. Ezt követően a sejteket 12 lyukú tenyésztő plate-en AIM-V tápfolyadékban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  $2 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban 5 nap alatt éretlen DS-ekké differenciáltattuk 80 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium) és 100 ng/ml IL-4 (PeproTech EC, London, UK) jelenlétében.

##### *A DS-ek kezelése és karakterizálása*

Az 5. napra éretlen DS-ekké differenciálódott sejteket 100 µg/ml parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) pollenszemekkel (RWP; Greer Laboratory, Lenoir, NC, USA) kezeltük, melyeket előzőleg 10 percig szobahőmérsékleten AIM-V tápfolyadékban hidratáltunk. A kontroll kísérletekben a DS-eket hőkezelt (72°C, 30 percig) parlagfű pollenszemekkel kezeltük (RWP<sup>H</sup>). Az oxidatív stressz DS-ekre gyakorolt hatását a pollenexpozíció előtt 1 órával a tenyészetbe adott antioxidáns (10 mM N-tert-butyl- $\alpha$  phenylnitron; PBN) alkalmazásával vizsgáltuk. 24 óra elteltével különböző citokinek mennyiségét detektáltuk a DS-ek felülúszóiból.

A DS-ek fenotípusos változásait 24 órás kezeléseket követően analizáltuk áramlási citometriával. A következő fluorokrómokkal jelölt ellenanyagokat használtuk: anti-CD83-FITC, anti-CD86-PE, anti-HLA-DR-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CD80-FITC és anti-CD40-PE (Immunotech, Marseille, France). A megfelelő izotípus kontroll ellenanyagok a BD Pharmingen-től származtak. A méréseket FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA)

végeztük és az adatelemzéshez WinMDI software-t (Joseph Trotter, La Jolla, CA, USA) használtunk.

### ***Intracelluláris ROS detektálása DS-ekben***

2'-7'-Dihidro-dichlorofluorescein diacetát (H<sub>2</sub>DCF-DA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével detektáltuk az RWP expozíció hatására bekövetkező intracelluláris ROS mennyiségének változását. A kezeletlen 5 napos éretlen DS-eket, valamint a PBN-el előkezelt DS-eket 50 µM H<sub>2</sub>DCF-DA-val jelöltük 37°C-on 30 percig. A felesleges festék eltávolítása után a sejteket RWP-vel, RWP<sup>H</sup>-val, RWP+PBN-el vagy NADPH oxidáz inhibitorral (diphenyleneiodonium, DPI) előkezelt RWP-vel stimuláltuk. A bekövetkező fluoreszcencia változásokat Synergy HT micro plate reader-rel (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) mértük (EX: 488 nm, EM: 530 nm).

### ***T sejt proliferáció vizsgálata***

Naív CD4<sup>+</sup> T sejteket negatív szelekcióval naív CD4<sup>+</sup> T sejt izoláló kit segítségével (Miltenyi Biotec) PBMC-ből szeparáltuk. A PBN jelenlétében vagy hiányában RWP-vel kezelt DS-eket, valamint a RWP<sup>H</sup>-val kezelt DS-eket 0,5 µM karboxifluorescein-szukcinimidil-észterrel (CFSE, Molecular Probes) jelölt allogén naív CD4<sup>+</sup> T sejtekkel tenyésztettük együtt 4 napig 0,5 µg/ml anti-humán CD3 (BD Pharmingen) jelenlétében. A DS-ek és T sejtek aránya 1:20. Pozitív kontrollként 10 µg/ml phytohemagglutinin-nal (PHA, Sigma-Aldrich) stimulált T sejteket használtunk. A méréseket FACSCalibur áramlási citométeren végeztük és az adatelemzéshez WinMDI software-t használtunk.

### ***T sejt aktiváció vizsgálata autológ DS-ek jelenlétében***

A naív CD4<sup>+</sup> T sejteket 3 atópiás és 3 egészséges donor véreből izoláltuk. Pollenkezelt és kezeletlen DS-eket (2x10<sup>4</sup>/lyuk) 4 napig autológ naív CD4<sup>+</sup> T sejtekkel (2x10<sup>5</sup>/lyuk) tenyésztettünk együtt 96 lyukú sejtenyésztő plate-ken AIM-V médiumban. Majd a letapadt DS-ekről eltávolított T sejteket 24 órán keresztül 5 µg/ml anti-CD3 ellenanyaggal fedett plate-eken reaktiváltuk. A T sejtek felülűszójában különböző citokinek mennyiségét határoztuk meg.

### ***Citokinmérések***

A DS-ek által termelt citokinek koncentrációját IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70) és TNF-α specifikus ELISA kit-ek (BD Pharmingen) segítségével határoztuk meg. A T sejtek által

termelt citokinek mennyiségét cytometric bead array használatával mértük. A Human Allergy Mediators Kit (BD Biosciences) segítségével az IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 és GM-CSF mennyiségét szimultán mértük a mintáinkban. A méréshez FACSCalibur áramlási citométert, az eredmények kiértékeléséhez pedig FCAP array software-t (BD Pharmingen) használtunk. A T sejtek felülúszójában az IFN- $\gamma$  mennyiségét humán IFN- $\gamma$  ELISA set (BD Pharmingen) segítségével határoztuk meg.

### ***IL-10 termelő T sejtek karakterizálása***

A DS-ekkel együtt tenyésztett autológ T sejteket 24 órán keresztül reaktiváltuk. A stimuláció utolsó 6 órájában monensint (GolgiStop, BD Biosciences) adtunk a sejtekhez, mely megakadályozza a termelt citokinek szekrécióját. A sejteket anti-CD25-FITC antitesttel (BD Pharmingen), a fixálás és permeabilizálás után pedig Foxp3-PE (eBioscience, San Diego, CA) és IL-10-APC (Miltenyi Biotec) ellenanyagokkal jelöltük. Az izotípus kontroll ellenanyagokat a BD Pharmingen-től szereztük be. A méréshez FACSCalibur áramlási citométert használtunk, az adatokat pedig FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA) segítségével értékeltük ki.

## **3.2 Inhomogén SMM hatása allergiás gyulladásra**

### ***Inhomogén SMM előállítása***

Az inhomogén SMM-t egy olyan berendezéssel állítottuk elő, mely 2 db mátrixból állt, melyek 10x10 mm-es neodímium-vas-bór (NdFeB) N35 (Br=1.20 T) henger mágneseket tartalmaztak. A négyzetrácsban egymás mellett szorosan elhelyezkedő mágnesek ellentétes polaritásúak voltak, akárcsak a két mátrixban egymással szemben elhelyezkedők. A két mátrix között lévő távolság 50 mm volt, ami lehetővé tette, hogy közéjük egy perforált falú műanyag ketrecet (140x100x46 mm) helyezzünk, melyben az expozíció ideje alatt a kísérleti állatok tartózkodtak, vagy sejttenyésztő plate-eket tegyünk az expozíciós térbe.

Annak érdekében, hogy két különböző erősségű mágneses indukció hatását vizsgáljuk ugyanolyan körülmények között, az *in vitro* kísérleteinkben a következő elrendezést használtuk: a két 6 lyukú sejttenyésztő plate-et egymásra helyeztük, melyeket a továbbiakban alsó illetve felső pozícióban elhelyezkedő plate-ként említjük. A sejttenyésztő plate magassága (12 mm) határozta meg a két szint közötti távolságot, így a sejttenyésztő felület távolsága a mágneses mátrixtól az alsó pozícióban 3 mm, a felső pozícióban pedig 15 mm volt.

A mátrixok síkjával párhuzamosan a csúcstól csúcsig mért mágneses indukció az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok esetében  $389,46 \pm 0,1$  és  $2,97 \pm 0,1$  mT, míg az oldalirányú indukció grádiensek  $39,25$  és  $0,22$  T/m volt  $3$  mm illetve  $15$  mm magasságban. A bőrtesztnél használt SMM értékek:  $192,28 \pm 0,1$  mT, az oldalirányú indukció grádiense  $18,89$  T/m volt a mágnesről  $3$  mm-re.

### ***Állatok, szenzitizálás, kiváltás és SMM expozíció***

Nőstény  $8$  hetes Balb/c (Charles River, Wilmington, MA, USA) egereket használtunk a kísérletekhez. Egyszerre  $3$  állatot tettünk ki az SMM expozíciónak, úgy hogy perforált műanyag ketrecekbe helyeztük az állatokat, és a ketreceket  $30$  vagy  $60$  percre a mágneses berendezésbe raktuk. A kontroll kísérletekben hasonló kalitkát alkalmaztunk az állatok mágneses térbe helyezése nélkül.

Az állatokat  $2$  intraperitoneális oltással  $1/3:1$  arányban alum adjuvánshoz (Pierce Laboratories, Rockford, IL, USA) adszorbeált  $150$   $\mu\text{g}$ /oltás parlagfű pollen kivonattal (RWPE, Greer Laboratories)/ szenzitizáltuk a  $0.$  és  $4.$  napon. A  $11.$  napon intranazálisan (in.) adott  $100$   $\mu\text{g}$  RWPE-vel váltottuk ki az allergiás gyulladást. Kontrollként in. PBS-t (PAA Laboratories, Pasching, Austria) használtunk. Az állatok terminálása a  $14.$  napon történt.

Az állatkísérletek kezelési protokolljait a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta.

### ***Allergiás gyulladás kimutatása***

A légutakba infiltrálódó gyulladós sejtek vizsgálata céljából a bronchoalveoláris mosófolyadék (BALF) analízisét  $72$  órával a nazális kiváltás után végeztük el. Teljes és differenciál sejtszámot is meghatároztuk Wright-Giemsa festést alkalmazva. A tüdők hisztológiai vizsgálatához a formalinban fixált tüdők keresztmetszeti szeleteit használtuk. A szubepitéliális régiókban bekövetkező gyulladás mértékének meghatározására hematoxilín-eozin festést alkalmaztunk, a mucintermelő sejteket pedig perjódsvavas Schiff festéssel mutattuk ki. Az így megfestett metszeteket Photometrics CoolSNAP Fx CCD (Tucson, AZ, USA) digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse TE 200 (Tokyo, Japan) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### ***Mucin szint mérése BALF mintákban***

MUC5AC mennyiségét ELISA technika segítségével mutattuk ki a BALF mintákban. A mintákat felező hígításban  $96$  lyukú plate-ekbe raktuk és  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Miután

megszáradtak a lyukak blokkoltuk, majd 1 órán keresztül biotinnal-konjugált egér monoklonális MUC5AC ellenanyaggal (1:10000) inkubáltuk. A mosási lépések után 1 órási inkubáció következett streptavidin-tormaperoxidázzal jelölt kecske anti-egér IgG-vel (1:10000). A peroxidáz szubsztátjának (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) hozzáadását követően a detektált színváltozást 450 nm-en mértük.

#### ***A légutak totál antioxidáns kapacitásának mérése***

Naív egereket intranazálisan RWPE-vel, ill. PBS-el kezeltünk, majd ezt követően azonnal 30 perces SMM vagy kontroll expozíciónak tettük ki őket. 15 perccel a kezelés után összegyűjtöttük a BALF mintákat. A minták centrifugálása után a felülúszók totál antioxidáns kapacitását spektrofotometriás eljárással 570 nm-en mértük Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) segítségével.

#### ***RWPE által termelt ROS mérése sejtmentes körülmények között és sejtenyészeten***

Parlagfű pollen kivonatot (100 µg/ml) és 50 µM H<sub>2</sub>DCF-DA-t inkubáltunk 100 µM NADPH-t tartalmazó PBS 6 lyukú platek-ben. A kontroll kísérletekben az elegy nem tartalmazott RWPE-t. Az epitelsejtekkel (A549) végzett kísérletekben a sejteket 50 µM H<sub>2</sub>DCF-DA-val inkubáltuk 37°C-on 15 percig. A felesleges festék eltávolítása után a sejteket PBS+NADPH-val vagy RWPE+NADPH-val kezeltük. A kezelések után a platek-et 30 percig kontroll vagy SMM expozíciónak tettük ki az alsó, ill. a felső pozíciónak megfelelően. A DCF fluoreszcencia változásokat Synergy HT microplate reader-el detektáltuk (EX: 488 nm, EM: 530 nm)

#### ***Humán bőrtesztek***

A vizsgálatokat 62 önkéntesen végeztük el (21 férfi és 41 nő, 22 és 50 év közöttiek). A résztvevők írásos beleegyező nyilatkozatot tettek. A kettős vak, randomizált vizsgálatot a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte és a Tüdőgyógyászati Klinika szakorvosának felügyelete mellett végeztük el.

A bőrteszteket mindkét alkar belső felületére egyszerre vittük fel. A vizsgálathoz pozitív kontrollt (hisztamin), negatív kontrollt (fiziológiás sóoldat) és négy különböző légúti allergént (poratka, macskaszőr, fűfélék, parlagfű) használtunk. A minták bőrbe juttatását követően az egyik kart azonnal a mágneses térbe, míg a másik kart az ál-expozíciós térbe helyeztük. A kialakult ödéma méretét a 15 perces expozíciót követően azonnal mértük.

### **Statisztikai analízis**

A pollenkezelt DS-ek funkcióit vizsgáló kísérletekben egy utas ANOVA-t követő Bonferroni vagy Dunett post hoc próbával végeztük az eredmények statisztikai értékelését. Pearson  $\chi^2$  tesztet használtunk a DS-T sejt kokultúrákban az aktivált T sejt populációk eloszlásának kiértékeléséhez.

Az SMM expozíció allergiás gyulladásra gyakorolt hatását vizsgáló kísérletekben egy utas ANOVA-t használtunk. A post hoc analízisekhez Games-Howell és Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk. Az eredményeket  $p < 0,05$  értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **4. Eredmények**

### **4.1 A parlagfű pollenszemek oxidatív stresszt indukálnak humán monocita eredetű DS-ekben**

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a pollenszemek NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkeznek, ezért megvizsgáltuk a pollenszemek oxidatív stressz indukáló képességét monocita eredetű DS-ekben. A pollen expozíció hatására megemelkedett DCF fluoreszcencia jelet detektáltunk a DS-ekben, mely változás nem volt megfigyelhető a sejtek hőinaktivált pollenszemekkel történő kezelését követően. A DPI-vel előkezelt pollenszemek szintén szignifikánsan kisebb mértékben növelték az intracelluláris ROS szintet az intakt pollenszemekhez viszonyítva. Az antioxidáns (PBN) jelenléte a sejt kultúrában nem befolyásolta az alap fluoreszcencia szintet, viszont csökkentette a parlagfű pollen-indukált oxidatív stressz szintjét a DS-ekben. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a pollen expozíció hatására oxidatív stressz alakul ki a DS-ekben, mely jelenség gátolható antioxidánssal, valamint a pollen NAD(P)H oxidázok fizikai és kémiai inaktivációjával.

### **4.2 A pollen-indukált oxidatív stressz befolyásolja a DS-ek citokintermelését és a sejt felszíni markereik expresszióját**

Ismert, hogy a ROS-ok direkt módon vagy az oxidatív úton módosított glikoproteineken keresztül képesek citokinek termelődését indukálni, ami kritikus pont a veleszületett immunválasz kiváltásában. Így a következőkben a pollen eredetű ROS-ok DS-ekre gyakorolt hatásait a sejtek által szekretált kemokin (IL-8) és a proinflammatorikus citokinek (TNF- $\alpha$  és IL-6) mennyiségén keresztül mértük.

24 órával a pollen expozíciót követően, szignifikánsan magasabb volt az IL-8, TNF- $\alpha$  és IL-6 szintje a pollenkezelt DS-ek felülúszójában, mint a kezeletlen sejtekében. Az antioxidáns (PBN) csökkentette az IL-8, TNF- $\alpha$  és az IL-6 felszabadulás mértékét a pollen expozíciónak kitett DS-ekben. Azt is kimutattuk, hogy az előzetes hőkezelés bár szignifikánsan csökkentette, de nem szüntette meg a parlagfű pollen azon képességét, hogy mediátorok felszabadulását indukálja a DS-ekből. Annak érdekében, hogy kizárjuk a lehetőségét, hogy a megfigyelt pollen-indukált DS aktiváció esetleg a pollenszemek LPS kontaminációjának az eredménye, meghatároztuk a pollen minták LPS tartalmát. Így kísérleteinkben az RWP LPS tartalmával azonos mennyiségű (16 pg/ml) *Escherichia coli*-ből származó LPS-t használtunk

kontrollként. Éretlen DS-ek ilyen koncentrációjú az LPS kezelés hatására nem termeltek IL-6, IL-8 és TNF- $\alpha$ -t.

A pollenkezelés kismértékű CD40 expresszió emelkedést eredményezett a DS-ek felszínén, míg a CD80, CD86, CD83 és HLA-DR expresszió jelentősen fokozódott. A hőkezelés csökkentette, de nem gátolta meg teljes mértékben a sejt felszíni markerek pollenszemek hatására bekövetkező fokozott kifejeződését a DS-eken. PBN jelenlétében nem következett be a DS-ek pollen-indukált érése. Az alacsony LPS koncentrációval kezelt DS-ek felszínén nem tapasztaltunk változást a kostimulációs és érési markerek kifejeződésében, így ezek a sejtek éretlen állapotban maradtak.

### **4.3 A pollen eredetű ROS-ok befolyásolják a DS-ek funkcióit**

#### ***4.3.1 A pollen indukált oxidatív stressz befolyásolja a DS-ek allostimuláló kapacitását***

A DS-eket a leghatékonyabb antigén prezentáló sejtekként tartják számon, ezért további munkánk során a pollenkezelt DS-ek allogen T sejt aktiváló kapacitását vizsgáltuk. A pollen kezelt DS-ek erős stimuláló hatást fejtenek ki a T sejtek proliferációjára. Azt is kimutattuk, hogy mind a pollenszemek előzetes hőkezelése, mind pedig a PBN jelenléte a pollen expozíció során csökkentette a DS-ek T sejt aktiváló kapacitását. A DS-ek 16 pg/ml LPS-sel való stimulálása az allogen T sejtek mérsékelt proliferációs választ eredményezte. Pozitív kontrollként phytohaemagglutinnel (PHA) stimulált naív CD4<sup>+</sup> T limfocitákat használtunk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pollen kezelt DS-ek allogen T sejt stimuláló kapacitása, ha csak részben is, de függ a pollen expozíció indukálta oxidatív stressztől.

#### ***4.3.2 A pollen eredetű ROS-ok megváltoztatják a DS-ek T sejt-polarizáló citokin termelését***

Mivel az IL-12 és IL-10 citokinek döntő szerepet játszanak a DS-ek T sejt polarizáló aktivitásában, megvizsgáltuk a DS-ekből felszabaduló IL-10 és IL-12 mennyiségét 24 órával a pollenexpozíciót követően. Az éretlen DS-ek kismértékben szekretáltak IL-12(p70)-t és RWP, RWP+PBN, RWP<sup>H</sup> kezelése hatására sem változott szignifikánsan a sejtek citokin termelése. Ugyanakkor a pollenkezelt DS-ek nagyobb mennyiségben termeltek IL-10-et, mint a kezeletlen sejtek. A DS-ek IL-10 szekréciója nem fokozódott a hőkezelt pollenekkel történt expozíció hatására. A PBN jelenléte a sejt kultúrákban gátolta a pollenkezelt DS-ek IL-10 termelését. A kontroll vizsgálatokban használt LPS (16pg/ml) kezelés nem volt hatással az IL-10 termelésre.

### **4.3.3 A pollen-indukált oxidatív stressz módosítja a DS-ek T sejt polarizáló kapacitását**

Annak érdekében, hogy a pollen NAD(P)H oxidázoknak a DS-ek T sejt polarizáló kapacitásában betöltött szerepét megvizsgáljuk, parlagfű allergiás és egészséges egyének véréből izolált T sejtek citokin termelését mértük pollen-kezelt autológ DS-ekkel történő aktivációt követően. A parlagfű pollen allergiásokból származó T sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-3-t termeltek az éretlen DS-ekkel való kokultivációt követően, mint az egészséges donorok T sejtjei. Azok a T sejtek, melyeket pollen-kezelt autológ DS-ekkel aktiváltunk nagyobb mennyiségben termeltek Th2 citokineket (IL-4 és IL-5), mint az éretlen DS-ekkel együtt tenyésztett T sejtek. Hasonló eredményt kaptunk a T sejtek által termelt GM-CSF esetében is. Azonban a különböző eredetű T sejtek citokin termelése között nem találtunk szignifikáns különbséget. A hőkezelt pollenszemekkel stimulált DS-ek kevésbé indukálták a T sejtek citokin termelését. Egyedül az IL-10 szekréciójában tapasztaltunk eltérést ezen megfigyeléseinkhez képest, ugyanis az IL-10 mennyisége szignifikánsan nagyobb volt az allergiás donorokból származó hőinaktivált pollenekkel kezelt autológ DS-ekkel kokultivált T sejtek felülúszójában. Kimutattuk továbbá, hogy az egészséges donorokból származó pollen kezelt DS-ekkel aktivált T sejtek nagyobb mértékben termelnek IFN- $\gamma$ -t, mint az allergiás donorokból származó T sejtek.

### **4.4 IL-10 termelő T sejtek karakterizálása**

A továbbiakban a parlagfű allergiásokból származó IL-10 termelő T limfocita alpopulációkat kívántuk azonosítani, melynek során először a CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T sejtek jelenlétét vizsgáltuk a T sejt kultúrákban autológ DS-ekkel történő aktiváció előtt és után. Éretlen DS-ekkel együtt tenyésztve megemelkedett a CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T sejtek aránya a sejttenyészetben. Pollenkezelt DS-ek hatására növekedett ezen sejttípus aránya, mely tovább emelkedett a hőkezelt pollenszemekkel kezelt DS és T sejt kokultúrákban. A pollenkezelt DS-ek nem befolyásolták az IL-10<sup>+</sup> T sejtek arányát a kezeletlen DS-ekhez képest. Míg a hőkezelt pollennel stimulált DS-ek hatására több IL-10<sup>+</sup> T sejtet detektáltunk. Eredményeink szerint kísérleti rendszerünkben az IL-10 citokin fő forrását a CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T sejtek képezték.

### **4.5 Az SMM expozíció nem befolyásolja az allergiás reakció szenzitizációs fázisát**

Előző kísérlet sorozatunkban kimutattuk, hogy a pollen eredetű oxidatív stressz képes befolyásolni a DS-ek funkcióit az allergiás reakciók szenzitizációs fázisában. Mivel az SMM a biológiai rendszerekre a ROS-okon keresztül is kifejtheti hatását, a következőkben szenzitizált egerekben vizsgáltuk az SMM expozíció hatását a pollen indukált légúti allergiás

gyulladásra. Előkísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a szenzitizációs fázis alatt naponta alkalmazott SMM nem befolyásolta az eozinofilek számát a BALF mintákban a kontrollhoz képest. Ezzel ellentétben a kiváltási szakaszban 3 egymást követő napon keresztül alkalmazott SMM jelentősen, de nem szignifikánsan csökkentette az eozinofilek számát. Eredményeink szerint az SMM expozíció az allergiás válasz szenzitizációs fázisát nem befolyásolta, így a továbbiakban az SMM expozíció kiváltási szakaszra gyakorolt hatását vizsgáltuk részletesebben.

#### **4.6 A kiváltási szakaszban alkalmazott SMM expozíció csökkenti a légúti allergiás gyulladás mértékét szenzitizált egerekben**

Kísérleteinkben RWPE-vel szenzitizált egereket használtunk, a nazális kezeléshez RWPE-t vagy PBS-t alkalmaztunk és SMM vagy kontroll expozíciónak tettük ki az állatokat. Kimutattuk, hogy már egyetlen 30 perces SMM expozíció hatására, közvetlenül az intranazális parlagfű pollenkivonat kezelés után, szignifikánsan csökkent a gyulladásos sejtek, köztük az eozinofilek száma a BALF mintákban, továbbá kisebb mértékű volt a légutak szubepiteliális régiójába infiltrálódó sejtek száma a kontroll expozíciónak kitett állatokéhoz képest. Továbbá csökkent az RWPE indukált mucintermelés és a légúti epitelsejtek metapláziája is. Az intranazális RWPE kezelést követő 3 napon keresztül alkalmazott napi 30 perces SMM expozíció szignifikánsan csökkentette a gyulladás mértékét. Az SMM kezelés időtartamának növelése (3x60 perc) további gyulladásos és eozinofil sejtszám csökkenést eredményezett a BALF mintákban, valamint a hisztológiai minták vizsgálatakor kimutattuk, hogy csökkent az infiltrálódó sejtek mennyisége a légutak szubepiteliális régióiba. A 3x60 perces SMM kezelés hatékonyabban csökkentette a MUC5AC szintet a BALF mintákban és kisebb mértékű volt a légúti epitelsejtek metapláziája a 3x30 perces kezeléshez viszonyítva.

#### **4.7 Az SMM expozíció hatása a pollenkivonat ROS termelő képességére sejtmentes körülmények között**

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk milyen mechanizmusok állnak az SMM expozíció légúti gyulladást gátló hatásai mögött, sejtmentes körülmények között teszteltük, vajon az SMM kezelés hatására csökken-e az RWPE ROS termelése. Kimutattuk, hogy a kontroll expozíciónak kitett RWPE 75-szeresre emelte a DCF fluoreszcencia intenzitását a PBS kontrollhoz képest. Azonban a 30 perces SMM expozíció sem az alsó, sem pedig a felső pozícióban alkalmazva nem befolyásolta az RWPE által indukált DCF fluoreszcencia jel emelkedést.

#### **4.8 Az SMM expozíció csökkenti a pollen kivonat által indukált oxidatív stressz mértékét epitél sejt tenyészetben**

Következő kísérleteinkben az SMM expozíció hatását vizsgáltuk RWPE indukált intracelluláris ROS szint növekedésre légúti hámsejtekben. A parlagfű pollen kivonattal kezelt A549 hámsejtekben a PBS-el kezeltékhez képest emelkedett DCF fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk, mely szignifikánsan csökkent az alsó pozícióban lévő plate-ekre ható SMM esetén. Az SMM expozíció sem az alsó, sem a felső pozícióban nem okozott szignifikáns változásokat az intracelluláris ROS szintekben a PBS-sel kezelt sejtenyészeteknél.

#### **4.9 Az SMM expozíció közvetlenül az intranazális RWPE kezelést követően csökkentette a légutak teljes antioxidáns kapacitásának pollen indukált emelkedését**

A tüdő hámsejt tenyészetekkel végzett kísérleteink eredményei alapján az SMM expozíciót követően a légutak ROS szintjét kívántuk vizsgálni RWPE kezelt egerekben. Ezekhez a vizsgálatokhoz SMM vagy kontroll expozíciónak kitett RWPE-vel vagy PBS-el kezelt naív egerek BALF mintáiból a légutak totál antioxidáns kapacitását határoztuk meg. Az RWPE kezelés hatására szignifikánsan magasabb volt a BALF minták antioxidáns kapacitása, mint a PBS kezelést követően. Kimutattuk, hogy egyetlen 30 perces SMM expozíció közvetlenül az intranazális RWPE kezelés után jelentősen mérsékelte a légutak teljes antioxidáns kapacitásának pollen-indukált növekedését. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az SMM expozíció az allergiás gyulladásra kifejtett pozitív hatását részben a ROS-ok modulálásán keresztül fejt ki a légutakban.

#### **4.10 AZ SMM expozíció nincs hatással a hízósejtek degranulációjára humán bőrben**

Számos bizonyíték igazolja, hogy a ROS-ok fontos szerepet játszanak különböző hízósejt válaszok szabályozásában. Így a következőkben az SMM expozíció hízósejtek degranulációjára gyakorolt közvetlen hatását tanulmányoztuk humán bőrtesztek elvégzésével. Bár a tesztelt allergének mindegyikénél, kivéve a poratka kivonatot, az SMM kezelés hatására kisebb mértékű volt az ödéma átmérője, egyedül a pozitív kontroll (hisztamin) esetében tapasztaltuk az ödéma átmérőjének szignifikáns csökkenését az SMM expozíció hatására. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az SMM expozíció képes szignifikánsan csökkenteni a hisztamin indukált ödéma kialakulását, míg az allergénekkal kiváltott hízósejt degranulációt csak kis mértékben befolyásolta.

## 5. Megbeszélés

A parlagfű pollent számos országban a legjelentősebb légúti allergének között tartják számon, mivel számos betegség (rhinitis, kötőhártya-gyulladás, allergiás asthma) leggyakoribb és legsúlyosabb tüneteit idézi elő. Bizonyított, hogy a pollenszemek nemcsak allergén fehérjéket hordoznak, hanem egyes komponenseik adjuvánsként is szerepet játszanak az allergiás reakciók szenzitizációs fázisában. Munkánk során a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS-ok szerepét vizsgáltuk az allergiás reakciók szenzitizációs valamint kiváltási fázisában.

Kimutattuk, hogy a pollen expozíció által kiváltott oxidatív stressz aktiválja a DS-eket. Azt a megfigyelésünket, hogy a pollenszemek oxidatív stresszt indukálnak DS-ekben korábbi *in vitro* és *in vivo* adatok is alátámasztják, miszerint légúti hámsejtekben a pollen NAD(P)H oxidázok növelték az intracelluláris ROS szintet. Továbbá eredményeink illeszkednek ahhoz a megfigyeléshez, hogy az SPP-k szintén képesek oxidatív stresszt indukálni monocita eredetű DS-ekben. Ugyanakkor a pollenszemek hőkezelése, mely eliminálja NAD(P)H oxidáz aktivitásukat, teljes mértékben nem akadályozta meg az oxidatív stressz kialakulását a DS-ekben, így egyéb pollen komponensek részvétele sem zárható ki a DS-ek aktivációjában.

Ismert, hogy az oxidatív stressz DS-ekben aktiválja az NF $\kappa$ B és MAPK szignalizációs útvonalakat, melyek a gyulladással citokin és kemokin gének transzkripciójáért és a fehérjék termeléséért felelősek. A pollenkezelést követően megemelkedett a DS-ek citokin szekréciója, melyet antioxidáns alkalmazásával gátolni tudtunk. Ez igazolja a DS-ekben kialakult oxidatív folyamatokat. További eredményeink azt mutatják, hogy a pollenszemek által indukált oxidatív stressz hatására fokozottabbá vált a DS-ek felszínén a kostimulátor molekulák és az érési marker kifejeződése, ami jól illeszkedik korábbi megfigyelésekhez, ahol a DS-ek CD80, CD83 és CD86 expressziójának növekedéséről számoltak be xantin/xantin oxidáz rendszer által termelt szuperoxid anionok hatására.

Az allergiás megbetegedések szempontjából igen fontos megvizsgálni a DS-ek IL-12 termelő képességét, mivel az alacsony IL-12 szint a Th2 irányú differenciációt támogatja. Eredményeink szerint a pollenkezelt DS-ek kismértékű IL-12 termelésére képesek, mely alátámasztja azt a megfigyelésünket, hogy a pollenszemek hatására félig érett DS-ek alakulnak ki.

Korábbi, légúti hámsejt tenyésztéssel végzett kísérletek szerint azokban a sejtekben indukálódott oxidatív stressz, melyek a pollenszemekkel közvetlen kontaktusba kerültek.

Eredményeink szerint a pollenkezelt DS-ek felszínén expresszáldott CD83 molekula igazolja, hogy a pollen expozíció hatására érett DS-ek alakultak ki, habár a sejtek kis hányadánál tapasztaltuk ezt a változást. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a sejtek különböző mértékű oxidatív stressznek voltak kitéve a tenyészetben a pollenszemektől való távolságuk függvényében. Így a pollenkezelt DS-T sejt kokultúrában a naív T sejtek különböző érési/aktivációs állapotban lévő DS-ekkel léphettek interakcióba, melynek eredményeként Th1, Th2 és IL-10 citokinek is detektálhatók ezen T sejtek felülűszójában. Megfigyeléseink jól illeszkednek egy korábbi munkához, mely leírta, hogy a pollenkezelt DS-ek elősegítik a naív T sejtek effektor sejtekké történő differenciációját, melyek Th1/Th2 citokinek termelésére is képesek. Habár a pollenkezelt DS-ek hatására megemelkedett a CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sejtek aránya a tenyészetben, mely tovább nőtt, ha a T sejteket hőinaktivált pollennel kezelt DS-ekkel tenyésztettük együtt, a kísérleti rendszerünkben az IL-10 termelésért a CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> fenotípussal rendelkező T sejtek felelősek. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a hőinaktivált pollennel kezelt DS-ek inkább tolerogén tulajdonságúak, mely a pollen NAD(P)H oxidázok DS-ek aktivációjában betöltött szerepének bizonyítéka.

A kísérleteink első részében tehát kimutattuk, hogy a pollenszemek által indukált oxidatív stressz DS-ekre gyakorolt hatása kettős: egyrészt fokozza a DS-ek proinflammatorikus citokin termelését, ezáltal részt vesz a helyi immunválaszokban, másrészt adjuvánsként szerepet játszik a pollen antigének elleni adaptív immunválasz kiváltásában is.

Az allergiás gyulladás patogenezise jól ismert, ugyanakkor kialakulásának pontos mechanizmusai kevésbé ismertek, így a gyógyítás során többségében csupán tüneti kezelésre van lehetőség. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy lokális antioxidánsok képesek gátolni a parlagfű pollen-indukált légúti allergiás gyulladást szenzitizált egerekben. Ezt a hatást azonban csak az allergénnel együtt adott vagy az intranazális pollen adását követően rövid időn belül alkalmazott antioxidánsok váltották ki. Így valószínűsíthető, hogy egy megemelt antioxidáns potenciál fenntartása új terápiás lehetőségeket vethet fel a pollen indukált légúti allergiás gyulladás kezelése során. Mivel az SMM expozíció hatással lehet a szabadgyökökre, így megvizsgáltuk, vajon befolyásolja-e az SMM expozíció a pollen indukált allergiás reakciók szenzitizációs vagy kiváltási fázisát szenzitizált egerekben.

Eredményeink szerint a szenzitizáció fázisában alkalmazott napi egyszeri SMM expozíció nem befolyásolta a kialakult allergiás gyulladás intenzitását.

További vizsgálatainkban részletesen tanulmányoztuk az SMM expozíció hatását allergiás reakció kiváltási fázisára. Jól ismert, hogy a reakció RWPE-vel történt kiváltása során a kezdeti neutrofilek toborzását az eozinofil granulociták beáramlása követi a légutakba, ahol

mindkét sejttípus hozzájárul az allergiás gyulladás során fellépő oxidatív stressz kialakulásához. Továbbá az oxidatív stresszre adott válaszként a légutak megemelkedett antioxidáns kapacitása is detektálható. Kísérleteink során kimutattuk, hogy egyetlen SMM kezelés közvetlenül az in. RWPE adását követően csökkentette az intranazális parlagfű pollenkoncentrációját hatására megemelkedett antioxidáns kapacitás szintjét és mérsékelte az allergiás gyulladást. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az SMM expozíció csökkenti a pollen NAD(P)H oxidázok által kiváltott kezdeti oxidatív stresszt. Továbbá ismételt, 3 egymást követő napon át történő SMM kezelés 6 órával az in. RWPE adását követően szintén hatékonyan csökkentette az allergiás reakciókat.

A továbbiakban az SMM ROS-okra kifejtett hatásmechanizmusát vizsgáltuk. A SMM expozíció sejtműködés körülmények között nem befolyásolta az RWPE NAD(P)H oxidázok ROS termelő képességét. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az SMM expozíció módosíthatja azokat a biokémiai reakciókat, melyekben egynél több párosítatlan elektron vesz részt. Kimutatták, hogy a B<sub>12</sub> függő etanolamin-ammónia-liáz enzim aktivitása megváltozik 100 mT SMM expozíció hatására. Hasonlóképpen vizsgálták hem enzimek, torma-peroxidáz és citokróm P-450 aktivitását is. Mivel a pollen NAD(P)H oxidázok komponenseit, szerkezetét és enzimátikus reakcióit még nem derítették fel teljes mértékben, így nincsenek korábbi adatok az SMM expozíció ezen enzimek szuperoxid termelő képességére.

Sejttenyésztésben végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az SMM kezelés hatására csökkent az RWPE indukált ROS termelés A549 tüdőepitél sejtekben. Bár az SMM antioxidáns hatásának molekuláris mechanizmusai még tisztázatlanok, vizsgálataink jól illeszkednek korábbi adatokhoz, melyek igazolták az SMM expozíció oxidatív stressz csökkentő hatását antioxidáns enzimek (pl. szuperoxid dizmutáz, glutation peroxidáz és kataláz) aktivitásának szabályozásán keresztül egér fibroblaszt sejtekben.

Annak érdekében, hogy az allergének kapcsolatba kerülhessenek a hízósejtekkel, keresztül kell jutniuk a hámsejtretegen. Az SMM hízósejtek degranulációjára kifejtett hatásának vizsgálatakor bőrteszteket végeztünk, melynek során apró karcolásokat ejtettünk a bőrön, lehetővé téve az allergének bejutását a bőrbe és a hízósejtek aktivációját. Ezekben a vizsgálatokban az allergén indukált ödéma pozitív kontrolljaként hisztamin használtunk. A humán vizsgálatunk eredményei azt mutatták, hogy az SMM expozíció szignifikánsan csökkentette a hisztamin által kiváltott ödéma átmérőjét, mely illeszkedik korábbi állatkísérletekből származó adatokhoz, ahol 15 és 30 perces közepes erősségű SMM kezelés (5-100 mT) közvetlenül a hisztamin beinjektálása után szignifikáns ödéma redukciót eredményezett. Kísérleti rendszerünkben a NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkező parlagfű

és fűfélék kivonatai által indukált ödéma méretét nem csökkentette az SMM expozíció, mely jelenségre az a korábbi megfigyelés adhat magyarázatot, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS-oknak nincs közvetlen hatása az IgE mediált hízósejt degranulációra.

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy érdemes lenne részletesebben tanulmányozni az MRI berendezések körüli SMM hatását, mely az általunk használt SMM generáló rendszerhez igen hasonló, különösképpen a nyílt terű MRI esetében, mivel az SMM jótékony hatással lehet a pollen indukált allergiás betegségekben.

## 6. Összefoglalás

A parlagfű pollen az allergiás megbetegedések – mint a rhinitis, kötőhártya-gyulladás és az allergiás asthma – egyik leggyakoribb és a legsúlyosabb tüneteket előidéző tényezője Közép Európában. Az allergiás megbetegedések patomechanizmusának számos részlete már jól ismert, de a folyamatokat elindító lépésekről még keveset tudunk.

A dendritikus sejtek (DS-ek) kulcsfontosságú szereppel bírnak az allergiás reakciók szenzitizációs fázisában, így munkánk során először a pollenszemek által termelt reaktív oxigéngyökök monocita-eredetű DS-ekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a pollen-expozíció oxidatív stresszt váltott ki a DS-ekben, melynek kialakulásához a NAD(P)H oxidázok mellett a pollenszemek egyéb komponensei is hozzájárultak. A megemelkedett intracelluláris reaktív oxigéngyök szint elősegítette az IL-8, a TNF- $\alpha$  valamint az IL-6 citokinek termelődését. A pollenszemekkel történő kölcsönhatást követően a DS-ek felszínén fokozódott a CD80, CD86, CD83 és HLA-DR molekulák kifejeződése. A pollenkezelt DS-ek elősegítették a naív T sejtek különböző citokineket (IL-3, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ ) termelő effektor T sejtekké történő differenciálódását. Az antioxidáns hozzáadása a tenyészethez gátolta a DS-ek fenotípusos és funkcionális változásait.

Ismert, hogy az oxidatív stressz hozzájárul az allergiás gyulladás kialakulásához. Bizonyított, hogy a statikus mágneses mező (SMM) által kifejtett biológiai hatások részben szabadgyökök által mediáltak, ezért a továbbiakban közepes erősségű SMM hatását vizsgáltuk az allergiás légúti gyulladás egér modelljében, valamint humán allergiás bőrteszt vizsgálatokban. Kimutattuk, hogy már egyetlen, 30 perces SMM expozíció közvetlenül az intranazális parlagfű pollenkivonat kezelés után jelentősen mérsékelte a légutak teljes antioxidáns kapacitásának pollen-indukált növekedését, valamint szignifikánsan csökkentette az allergiás gyulladás mértékét is. Ismételt (3 egymást követő napon) vagy megnövelt időtartamú (60 perces) SMM kezelés a nazális pollenkivonat adását követően hatékonyabban csökkentette az allergiás reakciókat, mint az egyszeri 30 perces kezelés. Az SMM expozíció sejtmentes körülmények között nem befolyásolta a pollenkivonat szabadgyök-termelő képességét, míg a pollenkivonat által indukált reaktív oxigéngyökök szintjét a légúti hámsejtekben csökkentette. A humán allergiás bőrtesztek eredményei szerint az SMM expozíciónak nincs közvetlen szignifikáns hatása a hízósejt degranulációra.

Eredményeink a pollen eredetű oxidatív stressz allergiás gyulladás szenzitizációs és kiváltási fázisában betöltött fontos szerepére hívják fel a figyelmet, valamint hozzájárulhatnak új terápiás eljárások kidolgozásához.

## 7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/97/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Csillag Anikó

Neptun kód: XTMLWO

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10034595

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csillag, A.**, Kumar, B.V., Szabó, K., Szilasi, M., Papp, Z., Szilasi, M.E., Pázmándi, K., Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., László, J.F.: Exposure to inhomogeneous static magnetic field beneficially affects allergic inflammation in a murine model.  
*J. R. Soc. Interface.* 11 (95), 20140097-20140097, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0097>  
IF:4.907 (2012)
2. **Csillag, A.**, Boldogh, I., Pázmándi, K., Magyarics, Z., Gogolák, P., Sur, S., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions.  
*J. Immunol.* 184 (5), 2377-2385, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803938>  
IF:5.745



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518–600  
E-mail [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [lib.unideb.hu](http://lib.unideb.hu)



---

További Közlemények

3. Pázmándi, K., Magyarics, Z., Boldogh, I., Csillag, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells.  
*Free Radic. Biol. Med.* 52 (3), 635-645, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.022>  
IF:5.271
4. Magyarics, Z., Csillag, A., Pázmándi, K., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening.  
*Cytometry A.* 73 (3), 254-258, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20529>  
IF:3.259

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19.182

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10.652

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.07



## **Előadások jegyzéke:**

Csillag A., Kumar B. V., Szabó K., Pázmándi K., Rajnavölgyi É., László J., Bácsi A.: Exposure to inhomogeneous static magnetic field decreases pollen-induced allergic airway inflammation in a murine model *6<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter School, 8-11 January 2013, Galyatető, Hungary*

Csillag A.: Egerek és emberek: A Th17 sejtek differenciációja és szerepe az allergiás megbetegedésekben *A Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság és a Magyar Immunológiai Társaság XVIII. Továbbképzése 2009. április 24-25. Mezőkövesd*

Csillag A., Boldogh I., Pazmandi K., Magyarics Z., Rajnavölgyi E., Bacs A.: Pollen-grain-induced Oxidative Stress Activates Dendritic Cells *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 2009 Annual Meeting 15 March 2009, Washington DC, USA*

Csillag A., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: A pollenszemek által termelt reaktív oxigéngyökök hatása a dendritikus sejtek működésére *A Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Napja, a Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Kongresszusa, 2006. nov. 17., Pécs*

## **Poszterek listája:**

Csillag A., Kumar B. V., Szabó K., Pázmándi K., Rajnavölgyi É., László J., Bácsi A.: Effect of static magnetic field on pollen-induced allergic airway inflammation in a murine model *Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlése, 2013. október 16-18., Pécs*

Csillag A., Kumar B. V., Szabo K., Pazmandi K., Rajnavölgyi E., Laszlo J., Bacs A.: Effect of static magnetic field on pollen-induced allergic airway inflammation in a murine model *15<sup>th</sup> International Congress of Immunology 22-27 August 2013, Milan, Italy*

Csillag A., Boldogh I., Pazmandi K., Magyarics Z., Gogolak P., Sur S., Rajnavölgyi E., Bacs A.: Pollen exposure-induced oxidative stress triggers phenotypic and functional changes of human monocyte-derived dendritic cell *8<sup>th</sup> EAACI GA<sup>2</sup>LEN Immunology Winter School 11-14 February 2010, Grainau, Germany*

Sipka S., Gyimesi E., Kovács I., Polonkay E., Csillag A., Kovács J., Balla G., Bácsi A.: Lactoferrin, interferon alpha, transforming growth factor beta and interleukin 17 measurements in the breast milks and sera of allergic and non-allergic human mothers. The advantageous effect of the prolonged continuous enteral treatment of mice with lactoferrin and interferon alpha on an allergic reaction *2nd European Congress of Immunology 13-16 September 2009, Berlin, Germany*

Pázmándi K., Magyarics Z., Csillag A., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: A reaktív oxigén gyökök lehetséges szerepe az immunológiai tolerancia kialakításában *Magyar Szabadgyök Kutató Társaság V. Kongresszusa 2009. augusztus 27-29. Szeged*

Csillag A., Boldogh I., Pazmandi K., Magyarics Z., Rajnavölgyi E., Bacs A.: Pollen-induced oxidative stress alters dendritic cell functions *Allergy & Asthma Symposium: Bridging Innate and Adaptive Immunity 28-29 May 2009, Brugges, Belgium*

Magyarics Z., Csillag A., Pázmándi K., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening *XXIV International Congress of ISAC (Int. Society for Analytical Cytology) 17-21th May 2008, Budapest, Hungary*

Csillag A., Magyarics Z., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív oxigéngyökök a dendritikus sejtek működésének megváltoztatásával befolyásolják a veleszületett és a szerzett immunválaszt is *XXXVI. MIT Vándorgyűlés, 2007. október 17-19. Hajdúszoboszló*

Csillag A., Rajnavölgyi E., Bacszi A.: Effect of reactive oxygen species generated by pollen grains on phenotypic and functional features of dendritic cells *2nd ENII-MUGEN Summer School in Advanced Immunology, 14-21 April 2007, Capo Caccia, Italy*

Csillag A., Magyarics Z., Rajnavölgyi E., Bacszi A.: Effect of reactive oxygen species generated by pollen grains on dendritic cell maturation *7th EFIS Tatra Immunology Conference, 24-28 June 2006, Slovakia*